

PGT/JP 2004/016285

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.10.2004

REC'D 16 DEC 2004

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 0 月 2 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 6 8 5 4 0
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 6 8 5 4 0]

出 願 人
Applicant(s): 帝人株式会社

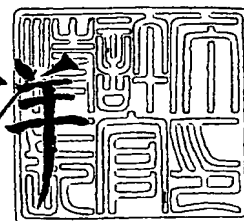
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 P37048
【提出日】 平成15年10月29日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C08B 37/08
A61L 27/00
A61L 31/00

【発明者】
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘 4 丁目 3 番 2 号 帝人株式会社 東京研究センター内
【氏名】 北 蘭 英一

【発明者】
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘 4 丁目 3 番 2 号 帝人株式会社 東京研究センター内
【氏名】 兼子 博章

【特許出願人】
【識別番号】 000003001
【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代理人】
【識別番号】 100099678
【弁理士】
【氏名又は名称】 三原 秀子

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 206048
【納付金額】 21,000円

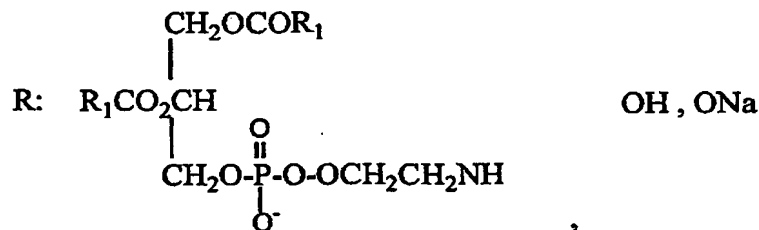
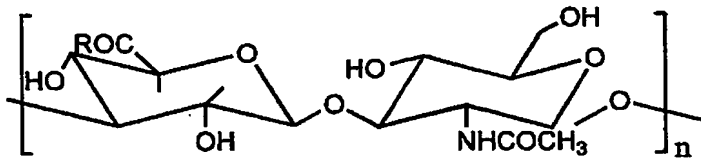
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0203001

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

下記一般式 (1) で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなる化合物であって、

【化 1】



..... (1)

(n は、300～30,000 の整数である。R は OH, ONa または上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R₁ は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数 12～28 のアルキルもしくはアルケンを示す。)

ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基 100 当量に対し、1～50 当量であるヒアルロン酸化合物。

【請求項 2】

該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである請求項 1 記載のヒアルロン酸化合物。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載のヒアルロン酸化合物からなるハイドロゲル。

【書類名】明細書

【発明の名称】高弾性ヒアルロン酸ハイドロゲル

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなるヒアルロン酸化合物及びそれからなるハイドロゲルに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒアルロン酸はその優れた保水能力や粘弾性及び高い生体親和性を示すため、バイオマテリアルとして広く利用されている。最近では、再生医療において膝軟骨損傷治療用の材料として検討がなされている。

(1) 不溶性ベンジルエステル化ヒアルロン酸を用いた細胞培養基材が知られている(特許文献1、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)が、膝軟骨の様に荷重のかかる部位においては、ヒアルロン酸は明らかに強度不足であり、この問題を解決するために架橋ヒアルロン酸の検討がなされている。

【0003】

しかし従来知られている架橋剤は、ビスエポキシド(特許文献2)、ジビニルスルホン(特許文献3、特許文献4)、ホルムアルデヒド(特許文献5)、ヒドラジドなどであり、生体に適用した時には安全性に不安がある。また化学反応を伴うために、副生成物の安全性の問題も考えられる。そのため化学反応を伴わない架橋方法、つまり水素結合、疎水性相互作用などを利用した物理架橋が求められているが、有効な手段が無いのが現状である。

【0004】

【特許文献1】米国特許第5939323号明細書

【特許文献2】特開平7-97401号公報

【特許文献3】米国特許第4582865号明細書

【特許文献4】米国特許第4605691号明細書

【特許文献5】特開昭60-130601号公報

【非特許文献1】J. Biomed. Mater. Res. 42:2, 172-81 (1998)

【非特許文献2】J. Biomed. Mater. Res. 46:3, 337-346 (1999)

【非特許文献3】J. Ortho. Res. 18:5, 773-380 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

膝軟骨の様に荷重のかかる部位においても使用可能な十分な強度を有し、生体に適用した場合においても安全なヒアルロン酸架橋物とそのハイドロゲルを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

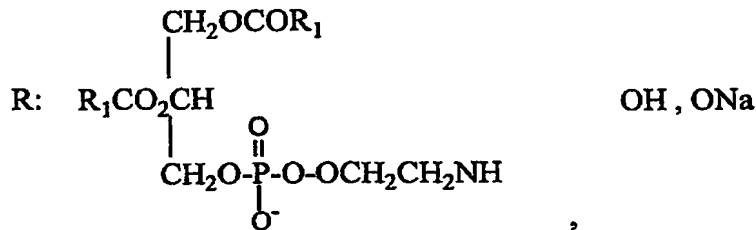
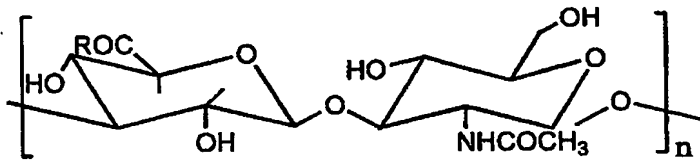
本発明の発明者は、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が生体に安全な物質でありかつヒアルロン酸の架橋に有効であることに着目し、ヒアルロン酸をホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体を用いて水素結合、疎水性相互作用などを利用した物理架橋することで得られるヒアルロン酸化合物および該化合物からなるヒアルロン酸ハイドロゲルが、膝軟骨の様に荷重のかかる部位においても使用可能な十分な強度を有する材料であることを見出し本発明に到達した。

【0007】

本発明は以下の通りである。

1. 下記一般式(1)で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなる化合物であって、

【化1】



..... (1)

(nは、300～30,000の整数である。RはOH, ONaまたは上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R₁は夫々同時または別個に、置換または無置換の炭素数12～28のアルキルもしくはアルケンを示す。)

上記ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1～50当量であるヒアルロン酸化合物。

2. 該ホスファチジルエタノールアミン誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである1に記載のヒアルロン酸化合物。

3. 1及び2に記載のヒアルロン酸ハイドロゲル。

【発明の効果】

【0008】

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなるヒアルロン酸化合物及びそのハイドロゲルに関する。このヒアルロン酸ハイドロゲルは高弾性を有し、再生医療における膝軟骨損傷治療用の材料として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明について詳述する。なお、これらの実施例等および説明は本発明を例示するものであり、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の趣旨に合致する限り他の実施の形態も本発明の範疇に属し得ることは言うまでもない。

【0010】

本発明で使用されているヒアルロン酸は、動物組織から抽出したもの、または発酵法で製造したものどちらでも使用できる。発酵法で使用する菌株はストレプトコッカス属のヒアルロン酸生産能を有する微生物であり、ストレプトコッカス・エクイFM-100(特開昭63-123392号公報)、ストレプトコッカス・エクイFM-300(特開平2-234689号公報)が挙げられる。これらの変異株を用いて培養、精製されたものを用いる。またヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ のものが好ましい。なお本発明でいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する。

【0011】

本発明で使用されているホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体は、動物組織から抽出したもの、または合成して製造したものどちらでも使用できる。ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体として以下のものが挙げられる。ジラウリルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアリルホスファチジルエタノールアミン、ジ

オレイルホスファチジルエタノールアミン、ジエイコシルホスファチジルエタノールアミン、ジドコシルホスファチジルエタノールアミン、ジテトラコシルホスファチジルエタノールアミン、ジヘキサコシルホスファチジルエタノールアミン、ジオクタコシルホスファチジルエタノールアミン。

その中でも、溶解性の面からジオレイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

【0012】

ホスファチジルエタノールアミンの含有量は、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1~50当量であることが好ましい。1当量より少ないとハイドロゲルを形成しない。また、50当量より多いと疎水性が高くなり不溶物が発生し、ハイドロゲルを形成しない。

【実施例】

【0013】

以下の実施例により本発明の詳細をより具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0014】

本実施例に使用したヒアルロン酸ナトリウムはストレプトコッカス属由来の平均分子量が1,000,000のヒアルロン酸ナトリウムであり、これは $n=3,500$ に相当する。その他の試薬については、テトラヒドロフラン、0.1M HCl、0.1M NaOH、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC)、1-Hydroxybenzotriazole (HOBt)、L-leucine methyl ester hydrochlorideは、和光純薬工業(株)、L- α -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(COATSOME ME-8181)は日本油脂(株)、3%アテロコラーゲンは高研(株)のものを使用した。

【0015】

[実施例1]

L- α -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン110mg(0.000033mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し10当量)を、テトラヒドロフラン/水=1/1(v/v)200mlに溶解した。この溶液に、ヒアルロン酸ナトリウム500mgを加え、0.1M HCl/0.1M NaOHを添加し、pH 6.8に調整した。1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 30mg(0.000033mol)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt) 25mg(0.000033mol)をテトラヒドロフラン/水=1/1の水溶液10mlに溶解し反応系に添加し、終夜攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。確認は¹H NMR(日本電子JNM-alpha400)により行い、目的物の生成を確認した。

【0016】

凍結乾燥品30mgをイオン交換水970mgに溶解し、濃度3wt%のハイドロゲルを調整した。このハイドロゲルの複素弾性率及びズリ降伏応力を調べるために、Rheometer RFIII、SRV(TA Instrument)を使用し、37℃で測定を行った。その結果を表1に示す。ここでいう、複素弾性率とは弾性体の応力とひずみの比を表す定数であり、ズリ降伏応力とはズリ応力を懸けた際、ゲルの構造が維持される最大応力を示す。

【0017】

[実施例2]

L- α -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン440mg(0.00012mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し40当量)、1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 120mg(0.000132mol)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt) 100mg(0.000132mol)とした以外は、実施例1と同様

。結果を表1に示す。

【0018】

[比較例1]

ヒアルロン酸ナトリウム 50mg にイオン交換水 5ml を加え攪拌を行い、ハイドロゲルを得た。物性評価については、実施例1と同様。結果を表1に示す。

【0019】

[比較例2]

米国特許第4,937,270号明細書を参考に追試実験を行った。詳細は以下の通りである。

ヒアルロン酸ナトリウム 400mg を水 40ml に溶解し、0.1M HCl により pH を 4.75 に調整した。

【0020】

1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC) 153mg(0.80mmol)、L-leucine methyl ester hydrochloride 182mg(1.0mmol) を添加し、5時間攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。物性評価については、実施例1と同様。結果を表1に示す。

【0021】

[比較例3]

アテロコラーゲンを使用した以外は、実施例1と同様の条件でアテロコラーゲンを測定した。結果を表1に示す。

【0022】

【表1】

各種ハイドロゲルの物性値

	材料	複素弾性率(Pa)	ズリ降伏応力(Pa)
実施例1	ヒアルロン酸-L- α -ジオレイル ホスファチジルエタノールアミン(10mol%)	421	1,083
実施例2	ヒアルロン酸-L- α -ジオレイル ホスファチジルエタノールアミン(40mol%)	902	1,734
比較例1	ヒアルロン酸ナトリウム	5	18
比較例2	架橋ヒアルロン酸	513	515
比較例3	アテロコラーゲン	293	919

【0023】

表1より、ヒアルロン酸-L- α -ジオレイルホスファチジルエタノールアミンは、ヒアルロン酸ナトリウム、アテロコラーゲンと比較し複素弾性率、降伏ズリ応力いずれも優れていることが明らかである。また、架橋ヒアルロン酸と比較した場合においても、同等またはそれ以上の機械特性を示すことが分かる。

【0024】

本発明で得られたヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンおよびその誘導体からなる高弾性ヒアルロン酸ハイドロゲルの弾性率は、200Pa 以上であり 200Pa 以下では膝関節部位に注入した際、形状を維持することが困難であることから膝軟骨損傷治療用の材料として有用であることが判る。

【産業上の利用可能性】

【0025】

上記高弾性ヒアルロン酸ハイドロゲルは、再生医療における膝軟骨損傷治療用の材料として有用である。

【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 膝軟骨の様に荷重のかかる部位においても使用可能な十分な強度を有し、生体に適用した場合においても安全なヒアルロン酸架橋物とそのハイドロゲルを提供する。

【解決手段】 特定の分子量を有するヒアルロン酸と特定の構造を有するホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体からなる化合物と当該化合物からなるハイドロゲルは、高い複素弾性率と降伏ズリ応力を有するので当該高弾性ハイドロゲルを膝軟骨損傷治療用の材料として提供する。

【選択図】 なし

特願 2003-368540

出願人履歴情報

識別番号

[000003001]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

氏 名

帝人株式会社